

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b><br><br><b>B01J 13/02</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | <b>A1</b> | <b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 94/04260</b><br><br><b>(43) Date de publication internationale:</b> 3 mars 1994 (03.03.94)                                                                                                                                                                                   |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR93/00791<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 4 août 1993 (04.08.93)<br><br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>92/10174                      20 août 1992 (20.08.92)                      FR<br><br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> COLETICA [FR/FR]; 32, rue S.-Jean-de-Dieu, F-69007 Lyon (FR).<br><br><b>(72) Inventeurs ; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) :</b> ORLY, Isabelle [FR/FR]; 9, rue Sala, F-69002 Lyon (FR). LEVY, Marie-Christine [FR/FR]; 18 ter, rue Houzeau-Muiron, F-51100 Reims (FR). PERRIER, Eric [FR/FR]; 23, boulevard F.-Point, F-38200 Vienne (FR).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |           | <b>(74) Mandataires:</b> PORTAL, Gérard etc. ; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).<br><br><b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, KR, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i> |
| <b>(54) Title:</b> METHOD FOR FABRICATING MICROPARTICLES IN EMULSION BY MODIFICATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF THE DISPERSED PHASE AFTER EMULSIFICATION<br><br><b>(54) Titre:</b> PROCEDE DE FABRICATION DE MICROPARTICULES EN EMULSION PAR MODIFICATION DE LA COMPOSITION CHIMIQUE DE LA PHASE DISPERSEE APRES EMULSIFICATION<br><br><b>(57) Abstract</b><br><br>The method for producing microparticles is characterized in that it comprises the following steps: preparation of an emulsion of a solution of a substance or a mixture of substances in a dispersing liquid wherein said substance or said mixture are substantially insoluble; incorporating to said dispersed phase a chemical agent substantially insoluble in the dispersing liquid so as to cause within the dispersed phase a chemical or physicochemical reaction responsible for the formation of microparticles which are then isolated.<br><br><b>(57) Abrégé</b><br><br>L'invention concerne un procédé de fabrication de microparticules. Ce procédé est caractérisé en ce que l'on prépare tout d'abord une émulsion d'une solution d'une substance ou d'un mélange de substances dans un liquide dispersant dans lequel ladite substance ou ledit mélange sont essentiellement insolubles, puis on incorpore à la phase dispersée un agent chimique, essentiellement insoluble dans le liquide dispersant de façon à provoquer au sein de la phase dispersée une réaction chimique ou physicochimique responsable de la formation de microparticules qui sont ensuite isolées. |           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |                                               |    |                       |
|----|---------------------------|----|-----------------------------------------------|----|-----------------------|
| AT | Autriche                  | FR | France                                        | MR | Mauritanie            |
| AU | Australie                 | GA | Gabon                                         | MW | Malawi                |
| BB | Barbade                   | GB | Royaume-Uni                                   | NE | Niger                 |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée                                        | NL | Pays-Bas              |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce                                         | NO | Norvège               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | NZ | Nouvelle-Zélande      |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | PL | Pologne               |
| BR | Brésil                    | IT | Italie                                        | PT | Portugal              |
| BY | Bélarus                   | JP | Japon                                         | RO | Roumanie              |
| CA | Canada                    | KP | République populaire démocratique<br>de Corée | RU | Fédération de Russie  |
| CF | République Centrafricaine | KR | République de Corée                           | SD | Soudan                |
| CG | Congo                     | KZ | Kazakhstan                                    | SE | Suède                 |
| CH | Suisse                    | LJ | Liechtenstein                                 | SI | Slovénie              |
| CI | Côte d'Ivoire             | LK | Sri Lanka                                     | SK | République slovaque   |
| CM | Cameroun                  | LU | Luxembourg                                    | SN | Sénégal               |
| CN | Chine                     | LV | Lettonie                                      | TD | Tchad                 |
| CS | Tchécoslovaquie           | MC | Monaco                                        | TC | Togo                  |
| CZ | République tchèque        | MG | Madagascar                                    | UA | Ukraine               |
| DE | Allemagne                 | ML | Mali                                          | US | Etats-Unis d'Amérique |
| DK | Danemark                  | MN | Mongolie                                      | UZ | Ouzbékistan           |
| ES | Espagne                   |    |                                               | VN | Viet Nam              |
| FI | Finlande                  |    |                                               |    |                       |

Procédé de fabrication de microparticules en émulsion par modification de la composition chimique de la phase dispersée après émulsification

La présente invention concerne essentiellement un procédé de fabrication de microparticules en émulsion par modification de la composition chimique de la phase dispersée après émulsification. Avantageusement, cette fabrication de microparticules est obtenue par réaction chimique ou physicochimique au sein de la phase dispersée d'une émulsion d'une substance ou d'un mélange de substances, par modification de la composition chimique de la phase dispersée après émulsification par incorporation d'un agent chimique essentiellement insoluble dans le liquide dispersant, pour provoquer ladite réaction.

Il est connu de former des microparticules par réaction chimique, par exemple, par les documents FR-A-2 444 497 Mars, FR-A-2 527 438 CNRS, ou encore 89 01221 BIOETICA qui décrivent la préparation de microcapsules par réticulation interfaciale d'une solution aqueuse de protéine ou d'un mélange de protéine et de polysaccharide au sein d'une phase hydrophobe à l'aide d'un agent bifonctionnel tel que les dichlorures d'acides.

Il est également connu de fabriquer des microparticules par modifications physicochimiques à partir de solutions de polymères mais il s'agit de procédés de coacervation dits de coacervation simple ou de coacervation complexe (document EP 0 273 823 A1 MERO ROUSSELOT SATIA, par exemple), selon que l'on fait intervenir respectivement un ou deux types de polymères. Dans ce document, la réaction de coacervation a lieu dans la phase dispersante conduisant ainsi à la formation d'une membrane qui se dépose sur les gouttelettes du liquide hydrophobe dispersé ou sur les particules du solide dispersé. Le procédé décrit dans ce document est, par ailleurs, limité à l'encapsulation d'un liquide hydrophobe ou d'un solide, l'encapsulation d'une phase aqueuse n'étant pas possible.

Le document US-A-4 217 370 RAWLINGS décrit un procédé de piégeage de microgouttelettes lipidiques dispersées dans une phase dispersante à base de substance protéique qui est précipitée par une modification de pH. Ainsi, ce procédé consiste à emprisonner des gouttelettes dans une matrice rigidifiée par précipitation de la phase dispersante.

Le document US-A-4 187 194 WELLMAN décrit un procédé d'encapsulation par évaporation de solvant.

Le document US-A-4 497 593 SIMKIN est relatif à un procédé classique de réticulation interfaciale selon lequel aucune modification chimique n'est réalisée au sein de la phase dispersée.

La présente invention permet de fabriquer des microparticules par une  
5 méthode différente des méthodes classiques de réticulation interfaciale ou de coacervation simple et complexe.

La présente invention a pour but de réaliser la fabrication de microparticules, en particulier de microcapsules, par un procédé de fabrication extrêmement simple, peu coûteux, présentant une bonne reproductibilité, donc une bonne  
10 fiabilité, permettant de régler la dimension des particules obtenues dans un large domaine de valeurs et surtout donnant la possibilité d'éviter l'utilisation d'agents réticulants bifonctionnels dont la présence résiduelle ou les produits de réaction sont susceptibles de compromettre la biocompatibilité des microparticules ou microcapsules ainsi formées, en le rendant ainsi très compétitif à l'échelle indus-  
15 trielle et de préférence adapté pour un usage cosmétique ou pharmaceutique ou encore alimentaire. L'invention a pour but de modifier la composition chimique ou physicochimique de la phase dispersée pour fabriquer des microparticules, en particulier des microcapsules.

La présente invention permet de résoudre simultanément ces  
20 exigences.

Ainsi, la présente invention fournit un procédé de fabrication de microparticules, en particulier de microcapsules, caractérisé en ce que l'on prépare tout d'abord une solution essentiellement homogène d'une substance ou d'un mélange de substances dans un solvant, que l'on réalise une émulsion de la solution  
25 dans un liquide dispersant formant une phase continue dans lequel ladite substance ou ledit mélange sont essentiellement insolubles, et formant une phase dispersée puis on déclenche une réaction chimique ou physicochimique dans la phase dispersée par modification de la composition chimique in situ de ladite substance ou dudit mélange dans la phase dispersée, en ajoutant un agent essentiellement non soluble ou non miscible dans ou à la phase continue, dans les conditions d'addition,  
30 en provoquant ainsi une modification de l'état physicochimique résultant en une insolubilisation de la substance ou du mélange de substances et en l'individualisation desdites microparticules qui sont ensuite récupérées.

L'objet de la présente invention repose essentiellement sur la possibi-  
35 lité parfaitement nouvelle pour l'homme de l'art d'être capable de modifier la composition chimique de la phase dispersée d'une émulsion après que la dispersion

ait été réalisée et ceci par l'intermédiaire d'agents non solubles ou non miscibles dans ou à la phase continue.

Selon une variante de réalisation avantageuse, l'agent essentiellement non soluble ou non miscible dans ou à la phase continue, dans les conditions  
5 d'addition, que l'on souhaite incorporer à la phase dispersée est présent à l'état dissous dans un solvant miscible au solvant de la phase dispersée et présentant une affinité pour le liquide dispersant de la phase continue inférieure à l'affinité vis-à-vis de la phase dispersée.

Selon une application particulière, cette opération permet, de façon  
10 tout à fait inattendue, de faire diffuser l'agent permettant le déclenchement de la réaction à travers une phase hydrophobe jusque dans les gouttelettes d'une solution aqueuse dispersée, alors qu'une solution aqueuse du même agent est parfaitement inefficace.

Comme substance ou mélange de substances utilisées pour la réalisation  
15 de la solution, on choisit de préférence des protéines, des polysaccharides ou des acides nucléiques, des mélanges de protéines, des mélanges de polysaccharides ou des mélanges de protéines et de polysaccharides, éventuellement avec des acides nucléiques.

Comme protéines, on peut citer les protéines purifiées suivantes :  
20 alpha-lactalbumine, bêta-lactoglobuline, caséines, ovalbumine, albumines animales, globulines sanguines, hémoglobine, fibrinogène, collagène, atelocollagène, gélatine, kératine, albumines végétales, globulines végétales, gluténines, gliadine ; les extraits protéiques issus du lait, de la soie, des céréales, des légumineuses, des algues, du poisson.

Comme polysaccharides, on peut citer l'agar, l'agarose, l'agaropectine,  
25 les carraghénanes, les alginates, les pectines, l'amylose, l'amylopectine, l'amidon, les amidons modifiés, les galactomannanes (guar, caroube), le glucomannane, le konjac, les celluloses modifiées, l'inuline, le xanthane, le dextrane, le curdlane, la gellane, le chitosan, les chondroïtines sulfates, l'acide hyaluronique, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate, l'héparine, le kératane sulfate.  
30

Comme acides nucléiques, on envisage l'acide ribonucléique et l'acide désoxyribonucléique.

Comme réaction chimique, on envisage la formation de liaisons covalentes en particulier des estérifications et des amidations ou la formation de  
35 liaisons ioniques entre les groupements ionisables d'une substance ou d'un mélange de substances.

Comme réaction physicochimique, on entend essentiellement des réactions telles que des réactions de coacervation, de précipitation ou de désolvatation.

5 Selon une autre variante de réalisation avantageuse du procédé, celui-ci est caractérisé en ce que l'agent essentiellement non soluble ou non miscible précité dans ou à la phase continue conduit à une séparation de phase au sein de la solution initialement homogène de la phase dispersée, ou à une gélification de ladite solution de la phase dispersée ou à une perte de solubilité de la phase dispersée par condensation ou par polymérisation.

10 Selon une autre variante de réalisation avantageuse du procédé, l'agent essentiellement non soluble ou non miscible précité dans ou à la phase continue, dans les conditions d'addition, est un non solvant pour la substance ou le mélange de substances solubilisé(s) dans le solvant de la phase dispersée, ou ledit agent conduit à une modification de pH, ou ledit agent comprend au moins un électro-  
15 lyte, ou ledit agent comprend au moins une molécule susceptible de réagir avec la ou les substances dissoutes dans la phase dispersée de l'émulsion.

Selon encore une autre variante de réalisation avantageuse, le non solvant précité pour la substance ou le mélange de substances solubilisé(s) dans le solvant de la phase dispersée, et essentiellement non miscible à la phase continue  
20 dans les conditions d'addition, provoque une insolubilisation de la phase dispersée, en particulier une gélification ou une coagulation.

Selon encore une autre variante de réalisation particulière, le non solvant précité est choisi parmi un alcool, en particulier un alcool inférieur en  $C_1$ - $C_6$ , de préférence l'alcool éthylique, ou une cétone, en particulier une cétone inférieure en  $C_2$ - $C_6$ , de préférence l'acétone.  
25

Selon un premier mode de réalisation avantageux, on réalise les étapes successives suivantes :

a) on prépare une solution aqueuse d'une substance choisie parmi les acides nucléiques, une protéine ou un polysaccharide ou les divers mélanges de ces  
30 substances ;

b) on prévoit un liquide hydrophobe dans lequel la substance ou les substances précitées sont essentiellement insolubles ;

c) on mélange le liquide hydrophobe et la phase aqueuse pour former une émulsion dans laquelle la solution aqueuse est la phase dispersée et le liquide  
35 hydrophobe est la phase continue ;

d) on ajoute à l'émulsion le non solvant de la substance solubilisée dans la phase dispersée, dans des proportions telles que ledit non solvant soit essentiellement non miscible à la phase continue en formant ainsi des microparticules par gélification ou coagulation ;

5 e) on recueille par des moyens de séparation physique, par exemple par filtration, centrifugation ou décantation, les microparticules formées par ladite gélification ou ladite coagulation ;

f) de préférence, on renforce la cohésion des microparticules par une réticulation.

10 Selon un deuxième mode de réalisation avantageux, on réalise tout d'abord une émulsion d'une solution aqueuse d'une substance ou d'un mélange de substances susceptibles de subir par réaction chimique ou physicochimique une variation d'état physicochimique traduite par une insolubilisation provoquée par une modification de pH, à un pH auquel l'état physicochimique de ladite substance  
15 ou dudit mélange de substances est celui d'une solution de viscosité appropriée à la réalisation d'une émulsion ; puis, on fait varier le pH, en ajoutant l'agent non soluble ou non miscible précité, comprenant une substance modifiant le pH dissoute dans un solvant organique miscible à la phase aqueuse, pour déclencher la réaction chimique ou physicochimique et amener la substance ou le mélange de  
20 substances dans un état physicochimique correspondant à une insolubilisation de la substance ou du mélange et qui conduit à la formation de microparticules physiquement individualisées.

Comme substance modifiant le pH, on utilise en général un acide, une base, ou un tampon en fonction de la valeur de pH souhaitée.

25 Selon une caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, la substance utilisée si l'on souhaite alcaliniser la phase dispersée de l'émulsion est une solution de soude ou de potasse dans un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol, utilisés purs ou renfermant 5 à 10 % (p/v) d'eau, ou encore un polyol, tel que le glycérol ou un polyéthylèneglycol. Selon une caractéristique préférée, la  
30 solution contient entre 0,5 et 10 % de soude dans l'éthanol 95 % (p/v).

Selon une autre caractéristique avantageuse des procédés selon l'invention, la substance utilisée si l'on souhaite acidifier la phase dispersée de l'émulsion est une solution d'un acide monocarboxylique ou polycarboxylique, porteur ou non de fonctions alcool, comme l'acide acétique, l'acide citrique, l'acide  
35 laétique, l'acide tartrique, l'acide succinique, l'acide malique, ou d'un acide minéral comme l'acide chlorhydrique, dans un alcool tel que le méthanol ou l'éthanol, purs

ou renfermant 5 à 10 % d'eau, ou encore dans un polyol, tel que le glycérol ou un polyéthylèneglycol. Selon une caractéristique préférée, la solution acide est constituée d'éthanol à 95 % contenant entre 1 et 10 % (v/v) d'acide acétique.

5 Selon un autre aspect, la réaction provoquée in situ par le changement de pH dans les gouttelettes de la phase dispersée est une réaction physicochimique de coacervation.

Dans ce cas, le procédé de fabrication des microparticules est avantageusement le suivant :

10 a) on prépare une solution aqueuse d'une substance choisie parmi les acides nucléiques, un polysaccharide ou une protéine ou les divers mélanges de ces substances, le pH étant choisi de façon que la substance ou le mélange de substances forme une solution essentiellement homogène, de viscosité compatible avec la réalisation d'une émulsion ;

15 b) on prévoit un liquide hydrophobe dans lequel la substance ou les substances précitées sont essentiellement insolubles ;

c) on mélange le liquide hydrophobe et la phase aqueuse pour former une émulsion ;

20 d) on ajoute à l'émulsion soit une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse si l'on souhaite alcaliniser la phase aqueuse ou une solution d'une substance acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse si l'on souhaite acidifier la phase aqueuse ;

e) après une période de temps prédéterminée nécessaire pour réaliser la coacervation de la ou des substances initialement solubilisées, on recueille les microparticules formées par centrifugation ou par filtration ;

25 f) de préférence, on renforce la cohésion des microparticules par une réticulation. La réticulation est préférée dans la majorité des cas.

Parmi les agents –classiques pour l'homme de l'art– de réticulation des composés polyaminés, polycarboxylés ou polyhydroxylés ou présentant un mélange de ces types de groupements, on citera à titre d'exemple un certain nombre de réactifs qui peuvent être regroupés en deux types.

30 Le premier type est constitué des agents bifonctionnels qui forment un pontage entre les groupements réactifs de la ou des substances constitutives des microparticules et subsistent dans le produit de réaction. Le formaldéhyde, le glutaraldéhyde, et les di-aldéhydes en général, les dichlorures d'acides, les di-anhydrides d'acides, les di-isocyanates, les di-imidoesters, les bis-chloroformiates, les succinimides font partie de ce type de réactifs.



Le second type de réactifs concerne les agents qui ne forment pas de pontage mais qui activent les groupements carboxyliques en particulier, de façon qu'ils puissent former des liaisons amides avec les groupements aminés ou des liaisons esters avec les fonctions alcools de la substance ou du mélange de substances mis en oeuvre pour la fabrication des microparticules. Les méthodes aux azides telles que décrites dans les documents EP-A-0301977 BIOETICA et WO 90/12055 BIOETICA ou utilisant des carbodiimides, par exemple, sont représentatives de ce type de méthodes.

Dans le cas où l'on souhaite préparer des microparticules de parfaite biocompatibilité, ce qui est absolument indispensable pour une utilisation pharmaceutique, on préférera particulièrement l'utilisation des méthodes du second type qui, permettant la formation de liaisons amides ou esters directement entre les groupements carboxyliques d'une part et aminés ou alcools d'autre part de la ou des substances constitutives des microparticules, conduisent à l'obtention tout à fait remarquable de microparticules constituées uniquement de la ou des substances mises en oeuvre pour la réalisation de l'émulsion, à l'exclusion de tout agent de réticulation.

Selon une variante particulière, la protéine utilisée est du collagène, en effet cette protéine est essentiellement soluble à pH inférieur à 4 et précipite à des pH supérieurs à cette valeur. On fabrique donc une solution de collagène à un pH voisin de 3,5. On réalise une émulsion par dispersion de la solution de collagène dans un liquide hydrophobe. On alcalinise les gouttelettes de la solution de collagène par addition à l'émulsion d'une solution alcoolique alcaline ce qui provoque une précipitation du collagène et ainsi une individualisation de microparticules de collagène que l'on peut récupérer par centrifugation ou par filtration et auquel on peut ensuite faire subir une réticulation selon les méthodes précitées.

Selon une caractéristique avantageuse de l'invention, la concentration de la solution de collagène est comprise entre 0,1 et 2 %, de préférence voisine de 0,5 % (p/v).

Selon une seconde variante particulière la protéine utilisée est un dérivé de collagène, de préférence l'atélocollagène.

Selon une caractéristique avantageuse de l'invention, la concentration de la solution d'atélocollagène est comprise entre 0,3 et 4 % (p/v).

Selon une troisième variante particulière, le polysaccharide utilisé est un glycosaminoglycane bien connu à l'homme de l'art. Les glycosaminoglycannes sont en particulier décrits dans le document antérieur du déposant

EP-A-0318154. Le polysaccharide utilisé peut également être le chitosan. Le chitosan est un polymère polyionique qui n'est soluble en phase aqueuse qu'à des pH inférieurs à 5. Lorsque le pH d'une solution de chitosan est amené à un pH proche de la neutralité, le polymère précipite en formant des fibrilles parfaitement insolubles dans l'eau. On peut tirer profit de cette propriété pour la réalisation de microcapsules selon l'invention. On prépare une solution de chitosan à pH acide, on réalise une émulsion dans un liquide hydrophobe, on modifie le pH de la phase dispersée par ajout, à l'émulsion, d'une base en solution alcoolique. La précipitation in situ permet la formation de microparticules facilement récupérables que l'on peut réticuler ultérieurement de façon chimique si nécessaire.

Selon une caractéristique avantageuse de l'invention, on préfère un chitosan hautement désacétylé et de très haut poids moléculaire, de préférence supérieur à 300 000 daltons. Par "hautement désacétylé" on entend de préférence un taux d'acétylation résiduel inférieur à environ 5 %, mieux 3,5%. De tels chitôsans hautement désacétylés sont disponibles dans le commerce.

Selon une caractéristique avantageuse de l'invention, la concentration de la solution de chitosan est comprise entre 0,2 et 10 %, de préférence voisine de 1 % (p/v).

Selon un second aspect de formation de sphères par variation du pH de la phase dispersée d'une émulsion, la formation de microcapsules est réalisée par déclenchement, une fois que l'émulsion est réalisée, d'une réaction chimique entre les groupements réactionnels d'une substance ou de substances mélangées.

La réaction chimique peut être, par exemple, une réaction de trans-acylation qui se produit à pH alcalin entre un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés, et soit une substance polyaminée comme par exemple une protéine, soit une substance polyhydroxylée comme par exemple un polysaccharide.

Dans ce cas, le procédé de fabrication des microparticules est avantageusement le suivant :

a) on prépare une solution aqueuse neutre donc non réactive renfermant d'une part un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés, et d'autre part soit une substance polyaminée comme par exemple une protéine, soit une substance polyhydroxylée comme par exemple un polysaccharide ;

b) on prévoit un liquide hydrophobe dans lequel le polysaccharide estérifié et la substance polyaminée ou polyhydroxylée sont essentiellement insolubles ;

5 c) on mélange le liquide hydrophobe et la solution aqueuse pour former une émulsion ;

d) on ajoute à l'émulsion une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse, ce qui permet l'obtention de conditions physicochimiques favorables au déroulement de la réaction entre la substance polyaminée ou la substance polyhydroxylée et le polysaccharide porteur des

10 groupements carboxyliques estérifiés ;  
e) après une période de temps prédéterminée nécessaire pour réaliser une réaction de transacylation, en formant ainsi des microparticules, en particulier des microcapsules, on réalise une neutralisation de l'émulsion, de préférence en ajoutant à l'émulsion une solution d'une substance acide dans un liquide organique

15 miscible à la phase aqueuse ; ce qui neutralise et stabilise les microparticules, en particulier les microcapsules formées.

Selon une variante de réalisation, on forme une émulsion de la solution aqueuse comme phase dispersée dans le liquide hydrophobe formant la phase continue.

20 Selon un second mode de mise à profit de l'invention, la modification de composition chimique induite in situ après réalisation de l'émulsion, est une modification de la concentration en certains électrolytes.

Un certain nombre de polysaccharides s'associent spécifiquement avec des ions ou des polyions pour former des gels.

25 En particulier un certain nombre de polysaccharides polyanioniques s'associent spécifiquement avec des cations ou des polycations, plus particulièrement avec des cations monovalents comme le potassium et le sodium ou bivalents comme le calcium, le magnésium, le strontium ou le baryum. Cette association se traduit par la formation de gels plus ou moins cassants en fonction de la nature du polysaccharide, du cation et des concentrations mises en oeuvre.

30 Selon une variante particulière, on réalisera un mélange de polysaccharides de façon à pouvoir moduler la cohésion du gel formé.

Comme polysaccharide préférentiellement utilisé, on choisit les carraghénanes kappa et iota, les pectines faiblement méthylées, les alginates et la

35 gomme gellane.

Selon une variante de réalisation, le polysaccharide est de la gomme gellane, qui est un polysaccharide polyanionique de très haut poids moléculaire (au moins 500 000 daltons) fabriqué par des microorganismes. Solubilisé dans l'eau, le gellane donne une solution de viscosité faible avec laquelle il est possible de réaliser une émulsion par dispersion dans une phase hydrophobe. Lorsqu'une telle émulsion est chauffée à une température supérieure à 75°C et que des cations sont ajoutés par un procédé selon l'invention, les gouttelettes de la phase dispersée subissent une gélification. Après retour à la température ambiante, il est possible de récupérer les sphères ainsi formées et de les réticuler ultérieurement de façon chimique si nécessaire.

Selon une caractéristique avantageuse du procédé selon l'invention, la concentration de la solution de gellane est comprise entre 0,1 et 5 % et encore mieux voisine de 0,6 % (p/v).

Selon une autre caractéristique du procédé de fabrication, on réalise une solution éthanolique contenant des ions calcium ou magnésium ou sodium ou potassium de façon à amener la solution à une concentration en ions comprise entre 1 et 400 mM, de préférence plutôt comprise entre 5 et 10 mM, pour les ions calcium et magnésium et de préférence comprise entre 150 et 250 mM pour les ions sodium et potassium.

Selon une autre variante de réalisation, le polysaccharide utilisé est un carraghénane kappa ou un carraghénane iota qui gélifie respectivement en présence d'ions potassium ou calcium.

Selon une caractéristique avantageuse du procédé selon l'invention, on dissout le carraghénane à froid, à pH neutre ou alcalin dans des concentrations comprises entre 0,1 et 5 % (p/v), de préférence voisines de 1,5 %. On élève la température autour de 80°C, puis on réalise une émulsion par dispersion dans un liquide hydrophobe. On provoque alors la gélification des gouttelettes par addition d'une solution alcoolique contenant des ions potassium ou calcium selon que la solution aqueuse contient du carraghénane kappa ou iota.

Selon une troisième variante de réalisation, le polysaccharide utilisé est une pectine faiblement méthylée qui forme des solutions gélifiables en présence d'ions calcium.

Selon une caractéristique avantageuse, on réalise une solution de pectine de concentration comprise entre 0,1 et 10 %, de préférence de l'ordre de 1 à 2 % (p/v), à froid, à pH neutre. On réalise une émulsion par dispersion dans un

liquide hydrophobe. Puis on rajoute, selon l'invention, des ions calcium sous forme d'une solution alcoolique de chlorure de calcium.

Selon une dernière variante de réalisation, on réalise le même type de procédé à partir d'une solution contenant de 1 à 5 % (p/v) d'alginate de sodium.

5 Enfin, selon encore un autre aspect, la présente invention concerne encore une composition telle qu'une composition cosmétique ou une composition pharmaceutique, ou une composition alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend des microparticules, en particulier des microcapsules, obtenues par le procédé précité.

10 D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront clairement à la lumière de la description explicative qui va suivre, faite en référence à plusieurs exemples de réalisation de l'invention donnés simplement à titre d'illustration et qui ne sauraient donc en aucune façon limiter la portée de l'invention. Dans les exemples, les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire.

### Exemple 1 de l'invention

#### Fabrication de microparticules d'atélocollagène

##### 20 a) Préparation de la phase aqueuse

On prépare une solution d'atélocollagène bovin à 2 % (p/v) dont le pH est ajusté à 4.

##### b) Emulsification

25 On émulsionne 40 ml de cette phase aqueuse dans 250 ml de cocoate d'éthyle-2-hexyle contenant 2 % v/v de Span 85® comme phase dispersante, par agitation mécanique pendant quelques minutes.

##### c) Alcalinisation

30 On ajoute deux fois 10 ml de soude à 2 % (p/v) dans de l'éthanol à 95 % à 10 min d'intervalle. On laisse la réaction se dérouler pendant 10 min après chaque ajout.

##### d) Lavages

35 Les microparticules sous forme de sphères sont recueillies par centrifugation, puis lavées dans plusieurs bains d'éthanol à 95 %.

e) Réticulation

Les sphères sont réticulées par incubation pendant 24 h à 4°C dans un bain de diméthylformamide contenant 0,5 % (v/v) de diphénylphosphorylazide, puis pendant 4 h à température ambiante dans du tampon borate pH 8,9 (tétra-  
5 borate de sodium 0,04 M, acide borique (0,04 M).

Après lavages à l'eau, les microparticules ainsi obtenues peuvent être lyophilisées.

Exemple 2 de l'invention

10 Fabrication de microparticules de chitosan

a) Préparation de la phase aqueuse

On prépare une solution à 1 % (p/v) de chitosan HPM hautement désacétylé (Aber Technologies) dans de l'acide acétique à 1,25 %, pH 4.  
15

b) Emulsification

On réalise une émulsion par dispersion de 50 ml de cette solution dans 250 ml de myristate d'isopropyle contenant 2 % (v/v) de Span 85®. L'émulsion est maintenue sous agitation mécanique pendant 10 min.  
20

c) Alcalinisation

On ajoute 16 ml de soude à 2 % p/v dans l'éthanol à 95 % et on poursuit l'agitation pendant 15 min.

25 d) Lavages

Les microparticules sont récupérées par centrifugation et lavées dans plusieurs bains d'éthanol, puis d'eau.

e) Réticulation

30 Les microparticules peuvent être réticulées selon l'exemple 1.

Exemple 3 selon l'invention

Fabrication de microparticules de diamètre moyen 150 µm à partir de sérum-albumine humaine (HSA) et d'alginate de propylèneglycol (PGA).  
35

a) Préparation de la phase aqueuse

On prépare, par agitation magnétique de 10 min à température ambiante, une solution dans l'eau distillée renfermant 20 % d'HSA (Centre de Transfusion Sanguine, Strasbourg) et 1 % d'un PGA présentant un taux d'estérification compris entre 80 et 85 % (Kelcoloïd S<sup>®</sup>, KELCO International).

b) Emulsification

On émulsionne 6 ml de cette phase aqueuse utilisée comme phase dispersée dans 40 ml de myristate d'isopropyle contenant 2 % v/v de Span 85<sup>®</sup> comme phase dispersante, par agitation mécanique de 5 min à 2 000 tr/min.

c) Alcalinisation

On ajoute à l'émulsion en agitation 2 ml d'une solution de soude à 2 % p/v dans l'éthanol à 95 % et on laisse la réaction de transacylation se développer pendant 15 min, ce qui produit des microparticules.

d) Acidification

On ajoute au milieu réactionnel en agitation 2 ml d'une solution à 7,6 % v/v d'acide acétique dans l'éthanol à 95 %. L'agitation est encore maintenue pendant 15 min de manière à permettre la neutralisation des microparticules formées.

e) Lavages

Les microparticules sont séparées par centrifugation, puis lavées par remises en suspension dans de l'éthanol à 95 % renfermant 2 % de Tween 20<sup>®</sup>, puis dans l'éthanol à 95 %, puis dans l'eau distillée.

Les microparticules peuvent être ensuite congelées et lyophilisées.

On obtient des sphères transparentes de taille moyenne 150  $\mu$ m. Après lyophilisation, la réhydratation de la poudre obtenue montre que les microparticules sont intactes et reprennent leur forme sphérique.

Essais de stabilité dans divers milieux contenant ou non des protéases

Dans des tubes à essais, des prises d'essai de 25 mg de microparticules lyophilisées sont réhydratées par addition de 1 ml d'eau distillée, puis additionnées de 7,5 ml de différents milieux :

– de l'eau distillée

– une solution de pH acide (1,2) additionnée ou non de pepsine (milieu gastrique artificiel, USP XXI)

– une solution de pH légèrement alcalin (7,5), additionnée ou non de trypsine (0,25 % p/v).

- 5 Les tubes sont incubés à 37°C. La stabilité des microparticules est étudiée par examen microscopique. Le temps de lyse est le temps au bout duquel toutes les microparticules ont disparu du milieu.

#### Résultats

- 10 Les microparticules préparées selon cet exemple sont stables plus de 3 j dans l'eau distillée comme dans les solutions de pH 1,2 ou de pH 7,5. Elles sont dégradées par les protéases : en 15 min par la pepsine, en 25 min par la trypsine.

#### Exemple 4 de l'invention

- 15 Fabrication de microparticules à partir de gélatine et de PGA.

#### Préparation de la phase aqueuse

- On prépare, à la température de 40°C, 8 ml d'une solution aqueuse de gélatine type B, bloom 150, à la concentration de 10 %, et de PGA à la  
20 concentration de 1 %.

#### Emulsification

- Dans un récipient thermostaté à 40°C, 6 ml de cette phase aqueuse sont émulsionnés dans 40 ml de myristate d'isopropyle contenant 2 % de Span 85 et  
25 préchauffés à la température de 40°C (vitesse d'agitation : 2 000 tr/min).

#### L'alcalinisation

- La neutralisation et les lavages sont ensuite effectués comme décrit dans l'exemple 3. Les microparticules apparaissent comme des sphères de diamètre  
30 moyen 1 mm. Après lyophilisation, elles donnent une poudre blanche qui se réhydrate facilement.

#### Exemple 5 de l'invention

- Fabrication de microparticules à partir d'atélocollagène et chondroïtine sulfate et  
35 de PGA.



Préparation de la phase aqueuse

Une solution à 1,6 % d'atélocollagène et 0,6 % de chondroïtine sulfate dans un tampon phosphate pH 7,4 est additionnée de PGA à la concentration de 0,7 %. Le protocole décrit à l'exemple 3 est ensuite appliqué à cette solution aqueuse.

On obtient des microparticules de diamètre moyen 600  $\mu\text{m}$ .

Exemple 6 de l'invention

Fabrication de microparticules à partir d'un concentré de protéines du lactosérum et de PGA.

Préparation de la phase aqueuse

Dans 16 ml d'eau distillée, on dissout 160 mg de PGA, et 3,2 g de concentré de protéines du lactosérum (Prosobel S65E<sup>®</sup>, Bel Industries).

Le protocole décrit à l'exemple 3 est ensuite reproduit en utilisant comme phase aqueuse 12 ml de la solution précédente et en doublant tous les volumes des différents réactifs.

On obtient des microparticules sphériques à contenu granuleux, de diamètre moyen 500  $\mu\text{m}$ , qui sont intactes après lyophilisation.

Exemple 7 de l'invention

Fabrication de microparticules à partir d'ovalbumine et de pectine.

Préparation de la phase aqueuse

Dans 8 ml d'eau distillée, on dissout 240 mg de pectine de pomme (FLUKA, estérification : 70 à 75 %), et 800 mg d'ovalbumine.

Puis le protocole décrit dans l'exemple 3 est appliqué, en utilisant 6 ml de la solution précédente, en remplaçant le myristate d'isopropyle par de l'huile de paraffine fluide, et en doublant les volumes des solutions alcaline et acide.

On obtient des microparticules de taille moyenne 200  $\mu\text{m}$ , à contenu granuleux.

Exemple 8 de l'invention

Fabrication de microparticules à partir de carboxyméthylcellulose (CMC) et de PGA.

Préparation de la phase aqueuse : dans 8 ml d'eau distillée, on dissout 80 mg de CMC (CMC 7 LF, degré de substitution : 0,7, HERCULES) et 320 mg de PGA, par agitation magnétique de 15 min à 40°C.

5 Puis le protocole décrit dans l'exemple 3 est appliqué, en utilisant 6 ml de la solution précédente.

On obtient des microparticules granuleuses de taille moyenne 1,8 mm.

#### Exemple 9 de l'invention

Fabrication de microparticules d'atélocollagène.

10

##### a) Préparation de la phase aqueuse

On prépare une solution d'atélocollagène bovin à 2 % (p/v) dont le pH est ajusté à 3,7 comme il est bien connu à l'homme de l'art notamment à partir de documents précédents du déposant tel que EP-A-0318154 auquel l'homme de l'art  
15 pourra se reporter.

##### b) Emulsification

On émulsionne 50 ml de cette phase dans 200 ml de cocoate d'éthyle-2-hexyle comme phase dispersante, par agitation mécanique pendant quelques  
20 minutes.

##### c) Addition du non-solvant

On ajoute 400 ml d'alcool éthylique à 95° sans arrêter l'agitation. On stoppe l'agitation au bout de quelques secondes ce qui provoque la précipitation de  
25 microparticules.

##### d) Lavage

Les microparticules obtenues sont recueillies par filtration, puis lavées dans plusieurs bains d'éthanol à 95°.

30

##### e) Réticulation

Les microparticules sont de préférence réticulées par incubation pendant 24 h à 4°C dans un bain de diméthylformamide contenant 0,5 % (v/v) de diphenylphosphorylazide, puis pendant 4 h à température ambiante dans du  
35 tampon borate pH 8,9.

Après lavage à l'eau, les microparticules ainsi obtenues peuvent être lyophilisées.

**Exemple 10 de l'invention**

**5 Fabrication de microparticules d'atélocollagène.**

Dans cet exemple, on procède comme décrit à l'exemple 9 si ce n'est que l'on remplace l'alcool éthylique par l'acétone comme non solvant pour précipiter les microparticules.

**10 Après plusieurs lavages des microparticules dans plusieurs bains d'acétone, on peut réaliser la réticulation comme décrit à l'exemple 9.**

Après lavage à l'eau, les microparticules peuvent aussi être lyophilisées.

**15 L'invention comprend tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs diverses combinaisons. En outre, l'invention comprend toute caractéristique qui apparaît être nouvelle vis-à-vis d'un état de la technique quelconque, à partir de la description prise dans son ensemble et incluant donc les revendications.**

## REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication de microparticules, en particulier de microcapsules, caractérisé en ce que l'on prépare tout d'abord une solution essentiellement homogène d'une substance ou d'un mélange de substances dans un solvant, que l'on réalise une émulsion de la solution dans un liquide dispersant formant une phase continue dans lequel ladite substance ou ledit mélange sont essentiellement insolubles, et formant une phase dispersée puis on déclenche une réaction chimique ou physicochimique dans la phase dispersée par modification de la composition chimique in situ de ladite substance ou dudit mélange dans la phase dispersée, en ajoutant un agent essentiellement non soluble ou non miscible dans ou à la phase continue, dans les conditions d'addition, en provoquant ainsi une modification de l'état physicochimique résultant en une insolubilisation de la substance ou du mélange de substances et en l'individualisation desdites microparticules qui sont ensuite récupérées.

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'agent essentiellement non soluble ou non miscible dans ou à la phase continue, dans les conditions d'addition, que l'on souhaite incorporer à la phase dispersée est présent à l'état dissous dans un solvant miscible au solvant de la phase dispersée et présentant une affinité pour le liquide dispersant de la phase continue inférieure à l'affinité vis-à-vis de la phase dispersée.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'on utilise comme substance ou mélange de substances précitées une substance choisie parmi des acides nucléiques, une protéine, ou un polysaccharide, ou les divers mélanges de ces substances.

4. Procédé selon la revendication 1 à 3, caractérisé en ce que comme réaction chimique, on réalise la formation de liaisons covalentes en particulier des estérifications et des amidations ou la formation de liaisons ioniques entre les groupements ionisables d'une substance ou d'un mélange de substances.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que comme réaction physicochimique, on réalise une réaction choisie parmi une réaction de coacervation, de précipitation ou de désolvation.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'agent essentiellement non soluble ou non miscible précité dans ou à la phase continue conduit à une séparation de phase au sein de la solution initialement homogène de la phase dispersée, ou à une gélification de ladite solution de la phase

dispersée ou à une perte de solubilité de la phase dispersée par condensation ou par polymérisation.

5 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 ou 6, caractérisé en ce que l'agent essentiellement non soluble ou non miscible précité dans ou à la phase continue, dans les conditions d'addition, est un non solvant pour la substance ou le mélange de substances solubilisé(s) dans le solvant de la phase dispersée, ou ledit agent conduit à une modification de pH, ou ledit agent comprend au moins un électrolyte, ou ledit agent comprend au moins une molécule susceptible de réagir avec la ou les substances dissoutes dans la phase dispersée de l'émulsion.

10 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 ou 5 à 7, caractérisé en ce que le non solvant pour la substance ou le mélange de substances solubilisé(s) dans le solvant de la phase dispersée, et essentiellement non miscible à la phase continue dans les conditions d'addition, provoque une insolubilisation de la phase dispersée, en particulier une gélification ou une coagulation.

15 9. Procédé selon l'une des revendications 5 à 8, caractérisé en ce que le non solvant est choisi parmi un alcool, en particulier un alcool inférieur en  $C_1-C_6$ , de préférence l'alcool éthylique, ou une cétone, en particulier une cétone inférieure en  $C_2-C_6$ , encore de préférence l'acétone.

20 10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on réalise les étapes successives suivantes :

a) on prépare une solution aqueuse d'une substance choisie parmi les acides nucléiques, une protéine ou un polysaccharide ou les divers mélanges de ces substances ;

25 b) on prévoit un liquide hydrophobe dans lequel la substance ou les substances précitées sont essentiellement insolubles ;

c) on mélange le liquide hydrophobe et la phase aqueuse pour former une émulsion dans laquelle la solution aqueuse est la phase dispersée et le liquide hydrophobe est la phase continue ;

30 d) on ajoute à l'émulsion le non solvant de la substance solubilisée dans la phase dispersée, dans des proportions telles que ledit non solvant soit essentiellement non miscible à la phase continue en formant ainsi des micro-particules par gélification ou coagulation ;

35 e) on recueille par des moyens de séparation physique, par exemple par filtration, centrifugation ou décantation, les microparticules formées par ladite gélification ou ladite coagulation ;

f) de préférence, on renforce la cohésion des microparticules par une réticulation.

11. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3 ou 7, caractérisé en ce qu'on réalise tout d'abord une émulsion d'une solution aqueuse d'une substance ou d'un mélange de substances susceptibles de subir par réaction chimique ou physicochimique une variation d'état physicochimique traduite par une insolubilisation provoquée par une modification de pH, à un pH auquel l'état physicochimique de ladite substance ou dudit mélange de substances est celui d'une solution de viscosité appropriée à la réalisation d'une émulsion ; puis on fait varier le pH, en ajoutant l'agent non soluble ou non miscible précité, comprenant une substance modifiant le pH dissoute dans un solvant organique miscible à la phase aqueuse, pour déclencher la réaction chimique ou physicochimique et amener la substance ou le mélange de substances dans un état physicochimique correspondant à une insolubilisation de la substance ou du mélange et qui conduit à la formation de microparticules physiquement individualisées.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'on utilise comme substance modifiant le pH un acide, une base ou un tampon en fonction de la valeur de pH souhaitée.

13. Procédé selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce qu'on réalise les étapes successives suivantes :

a) on prépare une solution aqueuse d'une substance choisie parmi les acides nucléiques, un polysaccharide ou une protéine ou les divers mélanges de ces substances, le pH étant choisi de façon que la substance ou le mélange de substances forme une solution essentiellement homogène de viscosité compatible avec la réalisation d'une émulsion ;

b) on prévoit un liquide hydrophobe dans lequel la substance ou les substances précitées sont essentiellement insolubles ;

c) on mélange le liquide hydrophobe et la phase aqueuse pour former une émulsion ;

d) on ajoute à l'émulsion soit une solution d'une substance alcaline dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse si l'on souhaite alcaliniser la phase aqueuse ou une solution d'une substance acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse si l'on souhaite acidifier la phase aqueuse ;

e) après une période de temps prédéterminée nécessaire pour réaliser la coacervation de la ou des substances initialement solubilisées, on recueille les microparticules formées par centrifugation ou par filtration ;

f) de préférence, on renforce la cohésion des microparticules par une réticulation.

14. Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on utilise comme agent de réticulation des composés polyaminés, polycarboxylés ou poly-  
5 hydroxylés précités ou de leur mélange, un agent bifonctionnel tel que le formaldéhyde, le glutaraldéhyde, et les di-aldéhydes, les dichlorures d'acides, les di-anhydrides d'acides, les di-isocyanates, les di-imidoesters, les bis-chloroformiates, les succinimides ; ou un agent d'activation de groupements carboxyliques pour former des liaisons amides avec les groupements aminés ou  
10 des liaisons esters avec les fonctions alcools de la substance ou du mélange de substances, tel qu'un carbodiimide ou un azide.

15. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'on utilise une protéine de préférence choisie parmi le collagène ou un dérivé de collagène, de préférence l'atélocollagène ; ou un polysaccharide de  
15 préférence choisi parmi un glycosaminoglycane ou le chitosan.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'on réalise une réaction chimique de transacylation qui se produit à pH alcalin entre un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés et soit une substance polyaminée comme par exemple une protéine, soit une substance poly-  
20 hydroxylée comme par exemple un polysaccharide porteur de groupements hydroxyles.

17. Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend :

a) on prépare une solution aqueuse neutre donc non réactive  
25 renfermant d'une part un polysaccharide porteur de groupements carboxyliques estérifiés, et d'autre part soit une substance polyaminée comme par exemple une protéine, soit une substance polyhydroxylée comme par exemple un polysaccharide porteur de groupements hydroxyles ;

b) on prévoit un liquide hydrophobe dans lequel le polysaccharide  
30 estérifié et la substance polyaminée ou polyhydroxylée sont essentiellement insolubles ;

c) on mélange le liquide hydrophobe et la solution aqueuse pour former une émulsion ;

d) on ajoute à l'émulsion une solution d'une substance alcaline dans un  
35 liquide organique miscible à la phase aqueuse, ce qui permet l'obtention de conditions physico-chimiques favorables au déroulement de la réaction entre la

substance polyaminée ou la substance polyhydroxylée et le polysaccharide porteur des groupements carboxyliques estérifiés ;

e) après une période de temps prédéterminée nécessaire pour réaliser une réaction de transacylation, en formant ainsi des microparticules, en particulier des microcapsules, on réalise une neutralisation de l'émulsion, de préférence en ajoutant à l'émulsion une solution d'une substance acide dans un liquide organique miscible à la phase aqueuse ; ce qui neutralise et stabilise les microparticules, en particulier les microcapsules formées.

18. Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'on forme une émulsion de la solution aqueuse comme phase dispersée dans le liquide hydrophobe formant la phase continue.

19. Procédé selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce qu'on utilise comme substance un polysaccharide capable de s'associer spécifiquement avec un ion ou un polyion pour former un gel, de préférence choisi parmi le carraghénane kappa et iota, une pectine faiblement méthylée, un alginate et la gomme gellane ayant de préférence un haut poids moléculaire d'au moins 500 000 daltons.

20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'on utilise du gellane à une concentration en solution aqueuse comprise entre 0,1 et 5 % et encore mieux voisine de 0,6 % (p/v).

21. Procédé selon la revendication 19 ou 20, caractérisé en ce qu'on réalise une solution éthanolique contenant des ions calcium ou magnésium ou sodium ou potassium de façon à amener la solution à une concentration en ions comprise entre 1 et 400 mM.

22. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'on utilise du carraghénane kappa ou iota qui se gélifie respectivement en présence d'ions potassium ou calcium ; on dissout le carraghénane à froid, à pH neutre ou alcalin dans des concentrations comprises entre 0,1 et 5 % (p/v), on élève la température autour de 80°C et on réalise une émulsion par dispersion dans un liquide hydrophobe ; on provoque ensuite la gélification des gouttelettes par addition d'une solution alcoolique contenant des ions potassium ou calcium selon que la solution aqueuse contienne du carraghénane kappa ou iota.

23. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'on utilise comme polysaccharide une pectine faiblement méthylée qui forme des solutions gélifiables en présence d'ions calcium ; la solution de pectine étant réalisée à une concentration comprise entre 0,1 et 10 % (p/v) à froid, à pH neutre, puis on réalise



une émulsion par dispersion dans un liquide hydrophobe, puis on rajoute enfin des ions calcium sous forme d'une solution alcoolique de chlorure de calcium.

24. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'on utilise comme polysaccharide une solution d'alginate de sodium à 1 à 5 % (p/v).

- 5 25. Composition telle qu'une composition cosmétique ou une composition pharmaceutique ou une composition alimentaire, caractérisée en ce qu'elle comprend des microparticules, en particulier des microcapsules, telles qu'obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 24 précitées.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/00791

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 5 B01J13/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                            | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | US,A,4 217 370 (RAWLINGS) 12 August 1980<br>cited in the application<br>see claims 1-4<br>---                 | 1,2,5-7,<br>11,12,15  |
| X         | US,A,4 187 194 (WELLMAN) 5 February 1980<br>cited in the application<br>see claims 1,6-8; examples 1-4<br>--- | 1,2,5-7               |
| A         | EP,A,0 273 823 (MERO ROUSSELOT SATIA) 6<br>July 1988<br>cited in the application<br>see claims 1-18<br>---    | 1-3,5,7,<br>11,12,15  |
| A         | US,A,4 497 793 (SIMKIN) 5 February 1985<br>cited in the application<br>see claims 1-5<br>-----                | 1,4,14                |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*A\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 November 1993

Date of mailing of the international search report

22. 11. 93

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

CUBAS ALCARAZ, J

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 93/00791

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US-A-4217370                              | 12-08-80            | AU-A- 3919678              | 28-02-80            |
|                                           |                     | BE-A- 869970               | 18-12-78            |
|                                           |                     | CA-A- 1095318              | 10-02-81            |
|                                           |                     | DE-A- 2837823              | 08-03-79            |
|                                           |                     | EP-A- 0006895              | 23-01-80            |
|                                           |                     | FR-A- 2400850              | 23-03-79            |
|                                           |                     | GB-A, B 2004727            | 11-04-79            |
|                                           |                     | JP-A- 54059363             | 12-05-79            |
|                                           |                     | LU-A- 79431                | 28-09-78            |
|                                           |                     | NL-A- 7808810              | 27-02-79            |
|                                           |                     | SE-A- 7808944              | 26-02-79            |
|                                           |                     | WO-A- 7900111              | 08-03-79            |
| US-A-4187194                              | 05-02-80            | BE-A- 793327               | 27-06-73            |
|                                           |                     | CA-A- 1008314              | 12-04-77            |
|                                           |                     | DE-A, C 2260740            | 19-07-73            |
|                                           |                     | GB-A- 1423292              | 04-02-76            |
|                                           |                     | JP-A- 48080478             | 27-10-73            |
|                                           |                     | NL-A- 7300098              | 26-03-73            |
| EP-A-0273823                              | 06-07-88            | FR-A- 2608456              | 24-06-88            |
|                                           |                     | JP-A- 63197540             | 16-08-88            |
|                                           |                     | US-A- 5051304              | 24-09-91            |
| US-A-4497793                              | 05-02-85            | EP-A- 0172934              | 05-03-86            |

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 93/00791A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 5 B01J13/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 5 B01J

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents                      | no. des revendications visées |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| X           | US,A,4 217 370 (RAWLINGS) 12 Août 1980<br>cité dans la demande<br>voir revendications 1-4<br>----                   | 1,2,5-7,<br>11,12,15          |
| X           | US,A,4 187 194 (WELLMAN) 5 Février 1980<br>cité dans la demande<br>voir revendications 1,6-8; exemples 1-4<br>----  | 1,2,5-7                       |
| A           | EP,A,0 273 823 (MERO ROUSSELOT SATIA) 6<br>Juillet 1988<br>cité dans la demande<br>voir revendications 1-18<br>---- | 1-3,5,7,<br>11,12,15          |
| A           | US,A,4 497 793 (SIMKIN) 5 Février 1985<br>cité dans la demande<br>voir revendications 1-5<br>-----                  | 1,4,14                        |

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

3 Novembre 1993

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22. 11. 93

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2240 HV Rijswijk  
Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

CUBAS ALCARAZ, J

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00791

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|-------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------|------------------------|
| US-A-4217370                                    | 12-08-80               | AU-A- 3919678                           | 28-02-80               |
|                                                 |                        | BE-A- 869970                            | 18-12-78               |
|                                                 |                        | CA-A- 1095318                           | 10-02-81               |
|                                                 |                        | DE-A- 2837823                           | 08-03-79               |
|                                                 |                        | EP-A- 0006895                           | 23-01-80               |
|                                                 |                        | FR-A- 2400850                           | 23-03-79               |
|                                                 |                        | GB-A, B 2004727                         | 11-04-79               |
|                                                 |                        | JP-A- 54059363                          | 12-05-79               |
|                                                 |                        | LU-A- 79431                             | 28-09-78               |
|                                                 |                        | NL-A- 7808810                           | 27-02-79               |
|                                                 |                        | SE-A- 7808944                           | 26-02-79               |
|                                                 |                        | WO-A- 7900111                           | 08-03-79               |
| US-A-4187194                                    | 05-02-80               | BE-A- 793327                            | 27-06-73               |
|                                                 |                        | CA-A- 1008314                           | 12-04-77               |
|                                                 |                        | DE-A, C 2260740                         | 19-07-73               |
|                                                 |                        | GB-A- 1423292                           | 04-02-76               |
|                                                 |                        | JP-A- 48080478                          | 27-10-73               |
|                                                 |                        | NL-A- 7300098                           | 26-03-73               |
| EP-A-0273823                                    | 06-07-88               | FR-A- 2608456                           | 24-06-88               |
|                                                 |                        | JP-A- 63197540                          | 16-08-88               |
|                                                 |                        | US-A- 5051304                           | 24-09-91               |
| US-A-4497793                                    | 05-02-85               | EP-A- 0172934                           | 05-03-86               |